



ノックアウトマウスを用いたDEAD-box RNA helicase D1Pas1の雄性生殖細胞における機能に関 する研究

著者	井上 弘貴
号	53
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1164号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122799

いのうえ ひろき

氏名（本籍地） 井上 弘 貴

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第 1164 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論文題目 ノックアウトマウスを用いた DEAD-box RNA helicase D1Pas1 の雄性生殖細胞における機能に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教授 種 村 健太郎

教授 豊 水 正 昭

教授 麻 生 久

博士論文内容要旨

ノックアウトマウスを用いた DEAD-box RNA helicase D1Pas1 の
雄性生殖細胞における機能に関する研究

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

井 上 弘 貴

指導教員

種村 健太郎 教授

第一章 緒言

精子発生とは精祖細胞の自己複製・分化、相同染色体の対合・組み換えを含む減数分裂と、核ヒストンのプロタミンへの置換、精子細胞の形態学および細胞生化学的变化を経て半数体である精子を作出する特殊な過程である。この精子発生過程での遺伝子発現は、時期特異的かつ厳密に制御されており、この時期の発現遺伝子をかく乱することは、精子発生や精子の機能に影響を与えることが知られている。DEAD box Family は 9 つの高度に保存されたドメインを持つ RNA helicase であり、RNA に結合し ATP を消費し RNA の二次構造を変化させる活性を持っている。この活性により RNA helicase は RNA の代謝すなわち転写、スプライシング、RNA の輸送、翻訳、分解などに深く関与することが知られている。マウス精巣で発現する DEAD box RNA helicase としては、Mouse vasa homolog (Mvh) がよく知られている。Mvh は精子発生過程において Mili や miRNA と相互作用しレトロトランスポゾン mRNA の分解および転写抑制機構に関与していることが近年明らかにされた。Mvh と同様、生殖細胞特異的に発現する DEAD box RNA helicase として D1Pas1 (pl10) がある。D1Pas1 遺伝子は第一染色体上に存在しており、そのホモログとしては X 染色体、Y 染色体にそれぞれ Ddx3x 遺伝子と Dby 遺伝子があることが知られている。この二つのホモログは精巣だけでなく脳、心臓、肺などのほかの組織でも広範に発現がみられ、最近、Ddx3x は胎盤形成や胚発生に重要な働きをしていることが組織特異的ノックアウト (KO) の解析により報告された。ヒトにおいても DDX3X および DBY は精巣での発現がみられるが、マウス D1Pas1 に相当する常染色体上のホモログ遺伝子は存在していない。ヒト DBY の欠損は生殖細胞が消失する Sertoli cell-only syndrome を引き起こすことから、DBY はヒトの精子発生に必須な因子として考えられている。一方で、マウスでは Dby 遺伝子が欠損していても精子細胞まで発生することが報告されていることから、少なくとも減数分裂の完了まで Dby は必須ではないと考えられている。そのためマウス精子発生においては D1Pas1 が Dby の機能を補填している可能性が考えられる。そこで、本研究では D1Pas1 に着目し、精子発生過程での D1Pas1 の機能を明らかにすることを目的とし、その KO マウスを作出、解析を行った。

第二章 D1Pas1 KO マウスの表現型解析

D1Pas1 の遺伝子は一つの exon のみで構成されている。exon 1 の開始コドンを含むタンパク質コード領域のほとんどを欠損させ、Lac Z 遺伝子 (β -Galactosidase をコード) を挿入した KO ES 細胞を米国 Knockout Mouse Project より導入し、D1Pas1 KO マウスを作出した (図 1-A)。前述の通り D1Pas1 は精巣での機能が示唆されているため、まずは妊性を調べるため交配実験を行った。その結果、ヘテロ KO (D1Pas1^{+/+}) 雌雄およびホモ KO (D1Pas1^{-/-}) 雌マウスは妊性があったが、D1Pas1^{+/+} 雄は不妊であることがわかった (図 1-B)。次に不妊の原因を調べるため、精巣および精巣上体の形態を解析した。D1Pas1^{+/+} の精巣重量は野生型と比較して 3 分 1 以下になっていた (図 1-C)。また、D1Pas1^{+/+} 精巣・精巣上体では精子および精子細胞が認められなかった。HE 染色により、D1Pas1^{+/+} は Stage VIII – IX でパキテン期精母細胞の脱落が起こっていることが明らかになった (図 1-D)。さらに TUNEL 法により、D1Pas1^{+/+} では stage VII – IX の間の精母細胞で細胞死を起こしていることを明らかにした (図 2-A)。続いて D1Pas1^{+/+} 精巣を用いた β -Galactosidase に対する免疫蛍光染色により、D1Pas1 が stage II – V の間のパキテン期精母細胞で mRNA 発現が開始することを明らかにした (図 2-B)。

第三章 D1Pas1 KO 精母細胞における核局在タンパク質の局在解析および

D1Pas1 KO 精巣におけるレトロトランスポゾンの発現解析

パキテン期精母細胞は精子発生過程のおよそ 4 分の 1 を占める非常に長い段階である。このパキテン期の初期で相同染色体の対合が完了し、相同組み換えとその修復を行うことが知られている。また、中期からは性染色体からの遺伝子発現が抑制される性染色体不活化が起こることが知られている。第二章の結果から、D1Pas1^{+/+} では stage VII の中期-後期パキテン期精母細胞で細胞死を引き起こすことが明らかとなった。そこで本章では D1Pas1^{+/+} 精母細胞においてこれらのパキテン期特異的な現象に異常がないか解析を行った。通常の免疫蛍光染色では観察できないため、chromosome spread と呼ばれる手法を用いて細胞質を除去し核を広げた後、免疫蛍光染色を行い核内のタンパク質の微小構造について解析した。SYCP1 および SYCP3 の局在に異常はなく、対合は正常に完了していることが明らかになった (図 3-A)。さらに相同組み換えの際の DNA 二重鎖の修復を行う Mlh1 も正常に局在していることから、相同組み換えも正常に起こっていることが示された (図 3-B)。また、性染色体不活性化の指標となる RNA polymerase II の XY 染色体への脱局在も正常に観察された (図 3-C)。

次に、パキテン期でのレトロトランスポゾンの転写抑制機構について解析を行った。パキテン期では D1Pas1 と同じ DEAD-box family の RNA helicase である Mvh がレト

ロトランスポゾンの抑制に重要な役割を果たしている。D1Pas1 についても同様の機能を持つ可能性があるため、D1Pas1^{+/+}においてもレトロトランスポゾンの過剰発現が起こっていないか発現解析を行った。定量 RT-PCR によりレトロトランスポゾン mRNA 発現を、免疫蛍光染色によりそのタンパク質の発現をそれぞれ調べた。その結果、mRNA 発現は D1Pas1^{+/+}でも発現の上昇は認められず、タンパク質発現の上昇も認められなかった (図 4-A, B)。さらに、バイサルファイトシーケンシングによりレトロトランスポゾン領域の DNA メチル化による抑制性修飾状態をしらべたところ、D1Pas1^{+/+}と同程度のメチル化修飾が蓄積していた (図 4-C)。以上の結果より、本章では D1Pas1^{+/+}精母細胞の原因の特定までは至らなかったが、相同染色体の対合・組み換え、性染色体の不活化およびレトロトランスポゾンの発現抑制は正常に起こっていることが明らかとなった。

第四章 D1Pas1 KO マウス精巣の網羅的遺伝子発現解析

本章では D1Pas1 欠損における遺伝子発現の異常を検索するために、マイクロアレイ法を用い D1Pas1^{+/+}マウスと野生型マウスの遺伝子発現を網羅的に解析した。KO マウスでは精子細胞が存在しないため、野生型のマウス精巣において、精子細胞の出現前で、かつ D1Pas1 の発現が認められる生後 18 日齢の精巣をマイクロアレイ解析に供した。マイクロアレイ解析の結果、D1Pas1^{+/+}では野生型と比較して 2921 遺伝子が 1/2 以下に発現低下、598 遺伝子が 2 倍以上に発現上昇していた (図 5-A, B)。これらの遺伝子をオンラインのバイオインフォマティクスリソースである DAVID を使用し Gene Ontology 解析を行った。D1Pas1^{+/+}で 1/2 以下に低下している遺伝子では sexual reproduction, male gamete generation や spermatogenesis などの生殖、精子発生関連の精巣特異的な遺伝子が多く含まれていることが分かった (図 5-C)。また D1Pas1^{+/+}で 2 倍以上に発現上昇している 598 遺伝子では defense response や transcription, gene expression, RNA metabolism の positive regulation に関する遺伝子が比較的多く含まれていた (図 5-D)。しかし、その p 値は有意ではあるものの (フィッシャーの正確確率検定)、発現低下遺伝子ほどには顕著ではなかった。マイクロアレイ解析の結果から、D1Pas1^{+/+}では精子形成に関与する遺伝子が発現低下し、転写や遺伝子発現の正の制御に関与するいくつかの遺伝子が発現上昇する傾向があることがわかった。発現低下遺伝子に関してはパキテン期精母細胞で精子発生が停止する表現型と一致した。発現上昇遺伝子については、精子発生関連の遺伝子が発現低下したことによる補償作用として転写の正の制御因子の発現が上昇した可能性も考えられた。

第五章 総括

本研究により、精巣特異的 RNA helicase D1Pas1 について以下のことが明らかとなった。

1. D1Pas1 は精子発生に必須の遺伝子であり、D1Pas1^{-/-}によりパキテン期精母細胞の stageVII – IX の中期-後期で細胞死を引き起こすことが明らかになった。

2. D1Pas1^{-/-} のパキテン期精母細胞では、相同染色体の対合、相同組み換え、組み換え後の二重鎖修復、レトロトランスポゾンの発現抑制といったパキテン期精母細胞での主要な現象は正常に起こっていることが明らかになった。

3. マイクロアレイ解析の結果、D1Pas1^{-/-} 精巣では遺伝子発現の正の制御関連の遺伝子が発現上昇する傾向があるのにも関わらず、精子発生、配偶子形成関連の遺伝子が発現低下していることが明らかになった。

D1Pas1 のマウス精巣での重要性は以前から示唆されていた。本研究では、D1Pas1 について初めて KO を作製し、その精子発生過程における必要性を初めて明らかにした。その機能は未だ不明瞭ではあるが、今後さらなる解析を進めることで、精巣における特異的な遺伝子発現制御機構に関する新たな知見を得られる可能性が期待できる。

図1

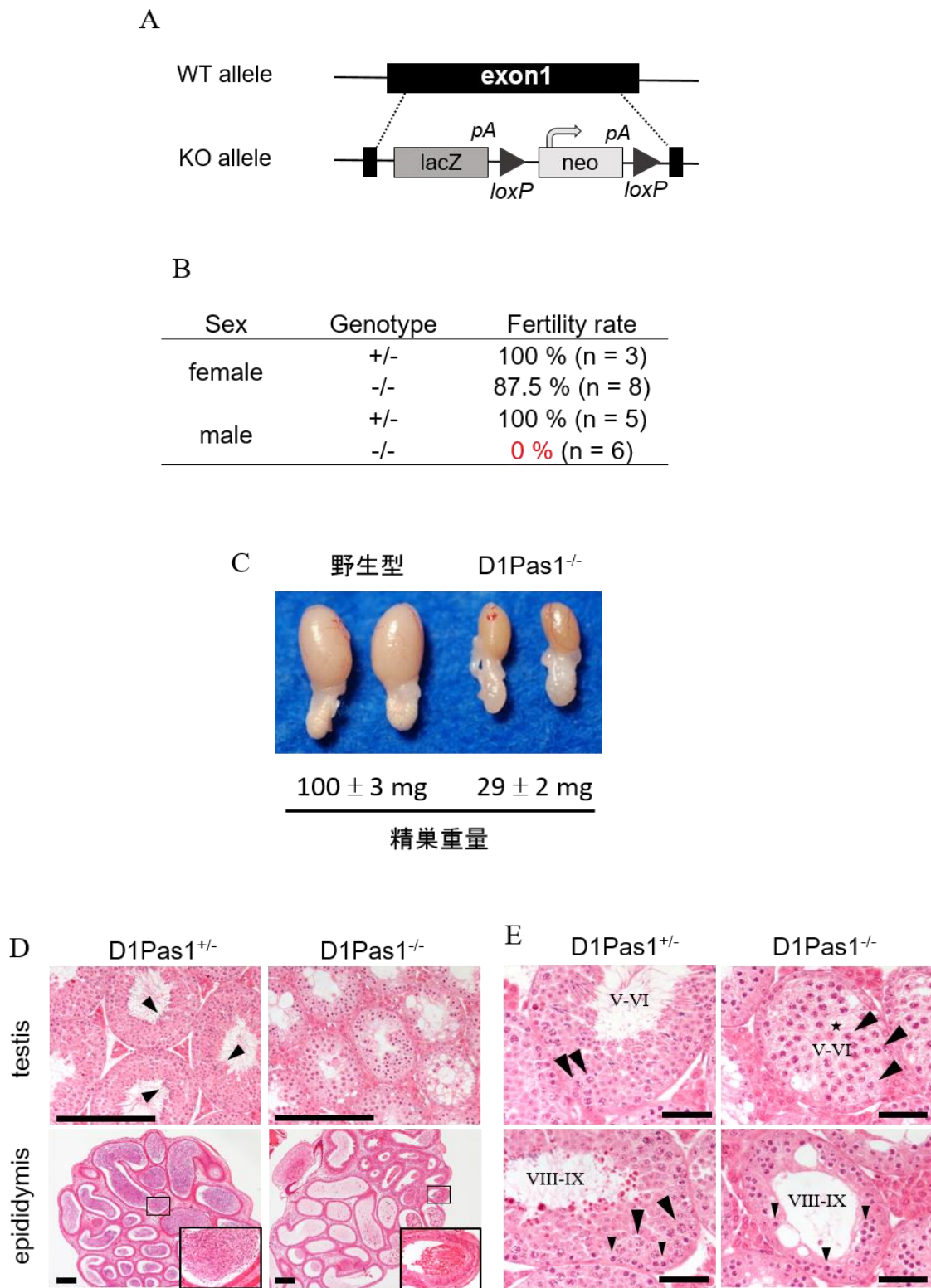


图2

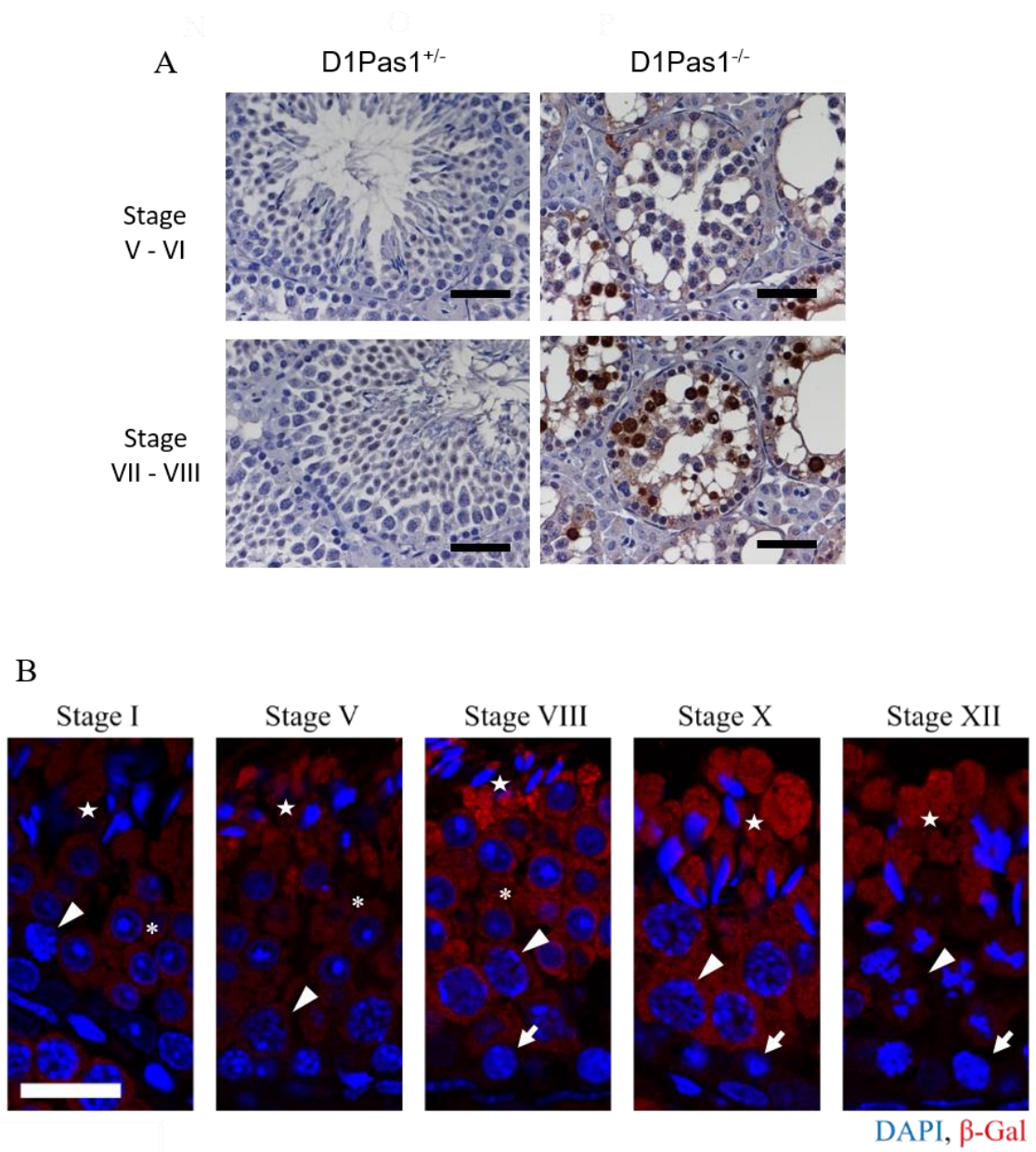
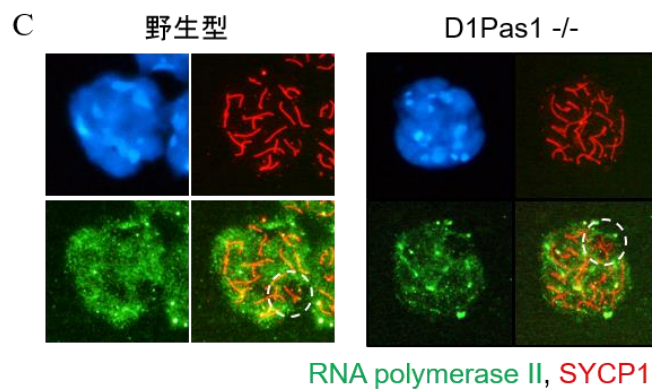
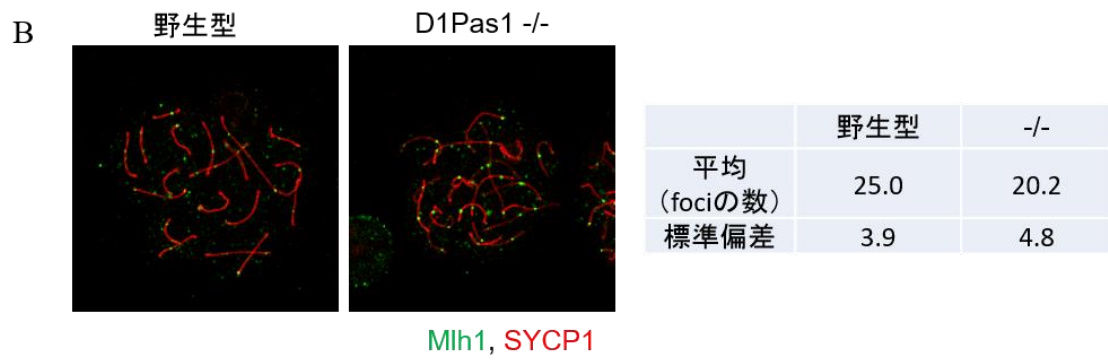
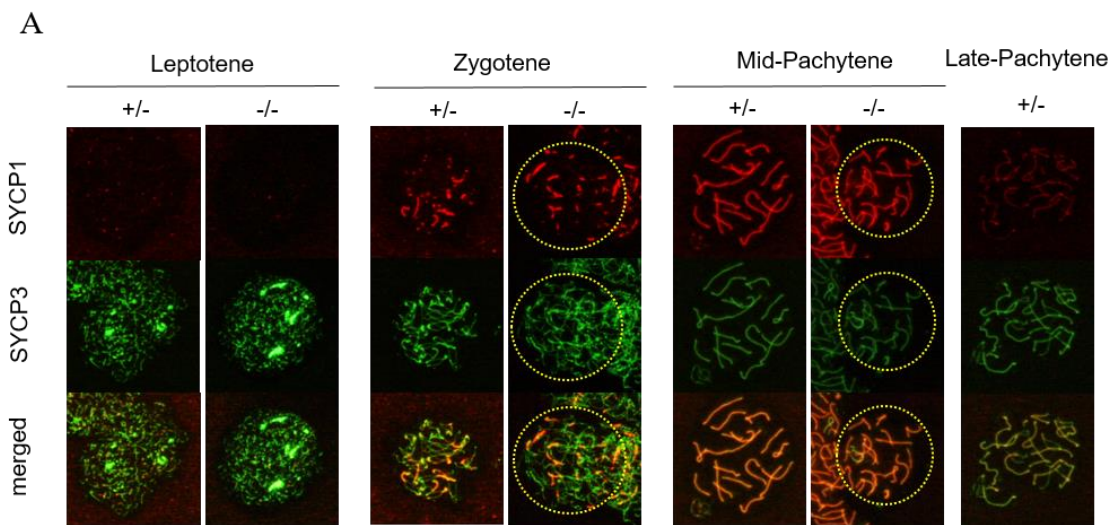


図3



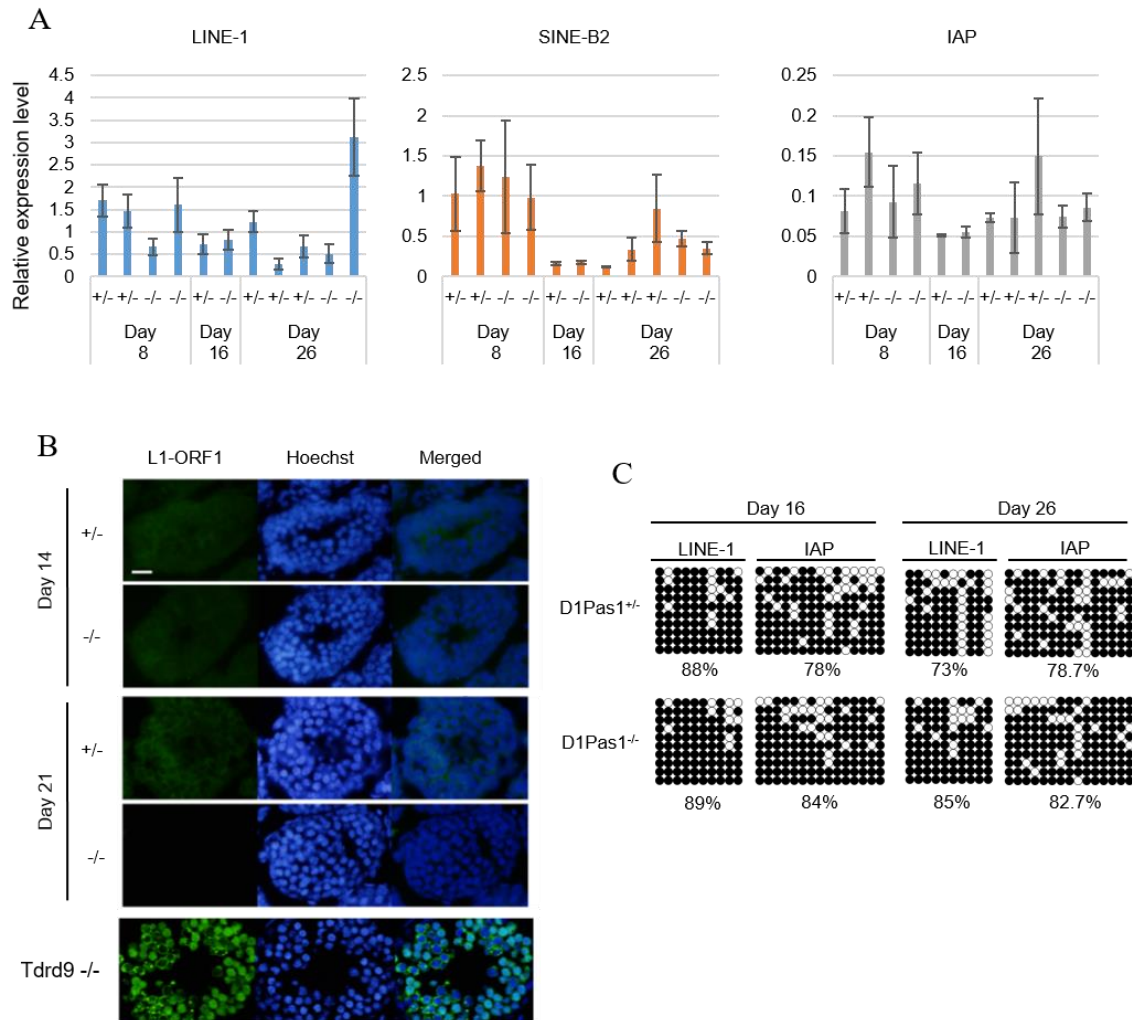
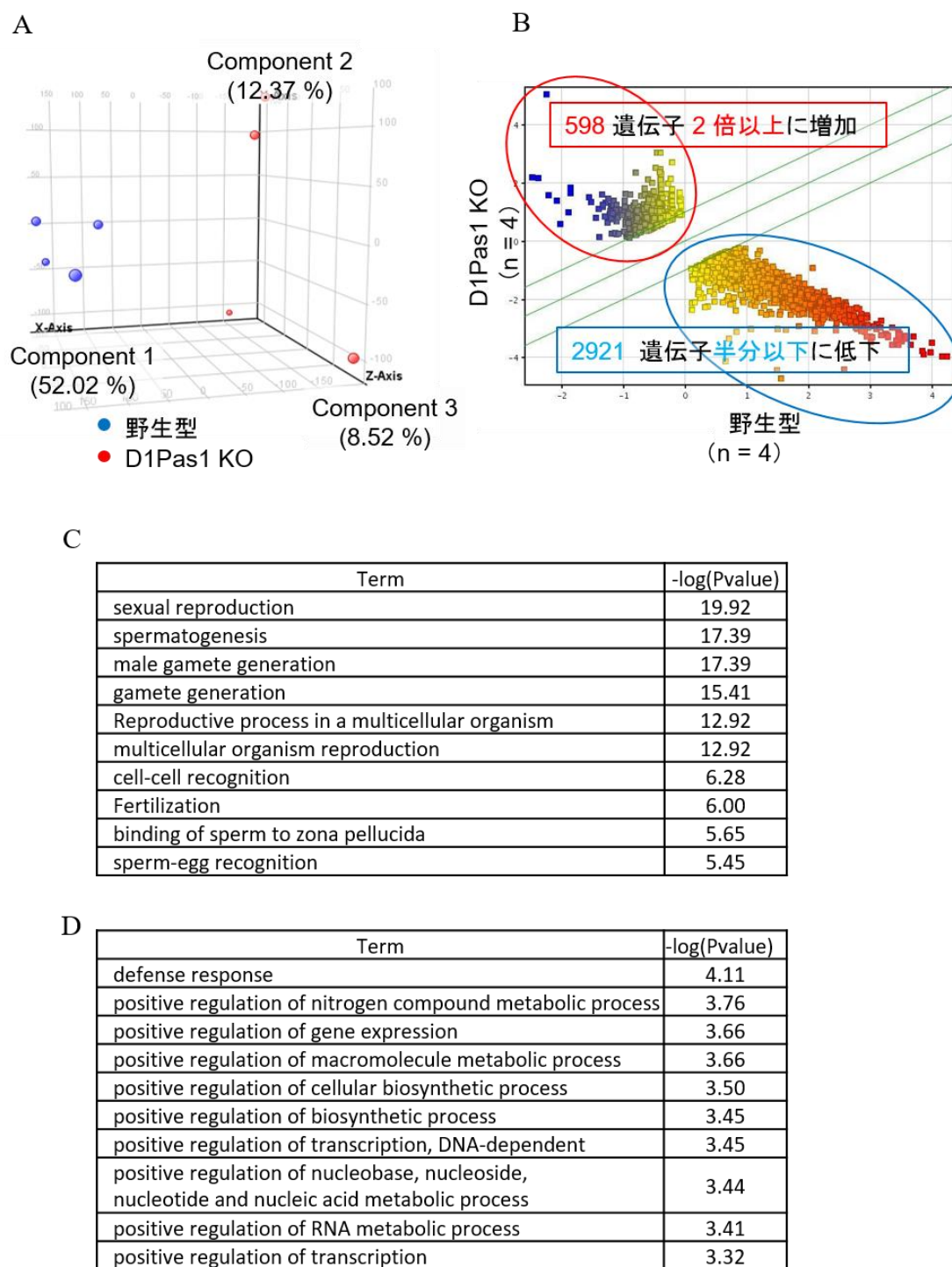


図5



論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	井上 弘貴
審査委員	主査：教授 種村 健太郎 副査：教授 豊水 正昭 教授 麻生 久
学位論文 題 目	ノックアウトマウスを用いた DEAD-box RNA helicase D1Pas1 の雄性生殖細胞における機能に関する研究
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
精子発生とは精祖細胞の自己複製・分化、相同染色体の対合・組み換えを含む減数分裂と、核ヒストンのプロタミンへの置換、精子細胞の形態学のおび細胞生化学的变化を経て半数体である精子を作出する特殊な過程である。精子発生過程での遺伝子発現は、時期特異的かつ厳密に制御されており、この時期の遺伝子発現をかく乱することは、精子発生や精子の機能に影響を与えることが知られている。したがって、精子発生過程における遺伝子発現制御機構の様式を理解することにより、優良家畜や希少動物の安定供給、保存、増産へ応用が期待される。 DEAD box Family は高度に保存された 9 つのドメインを持つ RNA helicase であり、ATP 依存的に RNA の二次構造を変化させる活性を持っている。この活性により RNA helicase は RNA の代謝すなわち転写、スプライシング、RNA の輸送、翻訳、分解などに深く関与することが知られている。D1Pas1 は生殖細胞特異的に発現する DEAD box RNA helicase の一つである。D1Pas1 の精巣における重要	

性は以前から示唆されているが、機能の詳細は未だ不明である。そこで本研究では精巣における D1Pas1 の着目し、ノックアウトマウスを作製、解析することで、その役割を検討した。得られた結果は以下の通りである。

1) D1Pas1 はマウス精子発生、特に第一減数分裂前期の正常な進行に必須であり、欠損雄マウスでは中期-後期パキテネ期ですべての精細胞が細胞死を引き起こすため不妊となることを明らかにし、D1Pas1 がマウスのパキテネ期精母細胞において重要な役割を担っていることを示した。

2) D1Pas1 ノックアウトマウス精母細胞においても相同染色体の対合、相同組み換え、XY Body の形成、性染色体の不活性化は正常に起こっており、形態学的に顕著な異常を示さないことを明らかにした。加えて、D1Pas1 と同じく DEAD box Family に属する Mvh とは異なり、レトロトランスポゾンの抑制制御にも必須ではないことを明らかにし、既知の精巣特異的 DEAD-box RNA helicase とは異なる新規の役割を担っていることを示唆した。

3) D1Pas1 ノックアウトマウス精巣においては野生型精巣とは遺伝子発現様式が大きく異なることを明らかにし、D1Pas1 が精子発生における遺伝子発現制御に関与している可能性を示唆した。

本研究により、マウス精子発生における D1Pas1 の重要性が初めて明らかとなった。本研究で得られた知見は、精子発生における新たな遺伝子発現制御機構の解明に貢献するものと考えられる。したがって審査の結果、本研究は博士(農学)の学位を与える価値のあるものと判定した。